

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 21—24, Januar 1971

Selektive Zunahme der Syntheserate von Dermatansulfat und Heparansulfat des Arteriengewebes bei genetischem bzw. experimentellem Hypertonus der Ratte

Von H. KRESSE, I. FILIPOVIC, F. WESSELS, G. WESSELS und E. BUDDECKE

Physiologisch-Chemisches Institut und Medizinische Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. H. Losse) der Universität Münster

(Eingegangen am 8. September 1970)

Aorten von je 10 Wistar-Ratten mit genetischem bzw. DOCA-induziertem Hypertonus werden *in vitro* für 6 Std. in Gegenwart von $30 \mu\text{C Na}_2^{35}\text{SO}_4$ bzw. $10 \mu\text{C Na-Acetat}[1-^{14}\text{C}]$ inkubiert. Bei der Bestimmung des Verteilungsmusters und der spezifischen Radioaktivität der Gesamt-Mucopolysaccharide, des Chondroitinsulfats, Dermatansulfats und Heparansulfats sowie der Lipide und der Lipidunterfraktionen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Im Vergleich zum Normotonus (100%) ist bei genetischem bzw. DOCA-induziertem Hypertonus der Absolutgehalt der sauren Mucopolysaccharide um 17% bzw. 15%, die in die sauren Mucopolysaccharide inkorporierte ^{35}S -Aktivität um 60 bzw. 56% erhöht.
2. Bei Normotonus verhalten sich die spezifischen Radioaktivitäten des Dermatansulfats, Heparansulfats und Chondroitinsulfats wie 1,0:0,9:0,4. Die spezifische Radioaktivität des Dermatansulfats beträgt 356000 Imp./Min. · mg. Bei genetischem bzw. DOCA-induziertem Hypertonus ist die spezifische Radioaktivität des Dermatansulfats um 23% bzw. 37%, diejenige des Heparansulfats um 25% bzw. 11% erhöht. Dagegen ist die spezifische Radioaktivität des Chondroitinsulfats unverändert bzw. um 35% herabgesetzt. Das Verhältnis der Syntheseraten bei Normotonus, genetischem Hypertonus und DOCA-induziertem Hypertonus beträgt für Dermatansulfat 1,0:1,3:1,5, für Heparansulfat 0,9:1,2:1,0 und für Chondroitinsulfat 0,4:0,37:0,26.
3. Der Lipidgehalt der Aorten ist bei genetischem Hypertonus unverändert, bei DOCA-Hypertonus um 20% herabgesetzt. Die in die Lipide inkorporierte ^{14}C -Radioaktivität und die spezifische Radioaktivität der Gesamtlipide und der Lipidunterfraktionen (Triglyceride, Phospholipide, freies Cholesterin, freie Fettsäuren) sind bei genetischem Hypertonus vermindert, bei DOCA-induziertem Hypertonus jedoch unverändert.

A selective increase in the rate of synthesis of dermatan sulphate and heparan sulphate of arterial tissue during genetic and experimental hypertension in the rat

Aortae from 10 Wistar rats with genetic or DOCA-induced hypertension were incubated *in vitro* for 6 hr in the presence of $30 \mu\text{C Na}_2^{35}\text{SO}_4$ or $10 \mu\text{C Na-acetate}[1-^{14}\text{C}]$. The distribution pattern and the specific radioactivity of the total mucopolysaccharides, chondroitin sulphate, dermatan sulphate and heparan sulphate, and of the lipids and the lipid subfractions were determined:

1. In comparison with normal tonus (100%), the absolute amount of acidic mucopolysaccharides was increased by 17% and 15%, and the incorporation of ^{35}S into acidic mucopolysaccharides was increased by 60% and 56% in genetic and DOCA-induced hypertension respectively.
2. In normal tonus the specific radioactivities of dermatan sulphate, heparan sulphate and chondroitin sulphate were found to be in the ratio 1.0:0.9:0.4. The specific radioactivity of the dermatan sulphate was 356000 counts/min · mg. In genetic and DOCA-induced hypertension, the specific radioactivity of the dermatan sulphate was increased by 23% and 37%, that of the heparan sulphate by 25% and 11%, respectively; the specific radioactivity of the chondroitin sulphate, however, remains unchanged and is decreased by 35%, respectively. The ratio of the rates of synthesis for normal tonus, genetic hypertension and DOCA-induced hypertension was 1.0:1.3:1.5 for dermatan sulphate, 0.9:1.2:1.0 for heparan sulphate, and 0.4:0.37:0.26 for chondroitin sulphate.
3. The lipid content of the aortae remained unchanged in genetic hypertension, and it was decreased by 20% in DOCA-hypertension. The ^{14}C incorporated into the lipids and the specific radioactivity of the total lipids and lipid subfractions (triglycerides, phospholipids, free cholesterol, free fatty acids) were decreased in genetic hypertension, but they were unchanged in DOCA-hypertension.

Ein renaler Hypertonus läßt sich bei Ratten, Kaninchen und Schweinen durch artifizielle Einengung der Nierenarterie mit oder ohne gleichzeitige Nephrektomie der kontralateralen Niere erzeugen (1—4). Chronischer renaler Hypertonus führt zu einer Zunahme der Glucoseutilisation und Lactatbildung des Arteriengewebes (2), zu vermehrtem Einbau von ^{35}S -Sulfat in die sulfatierten Mucopolysaccharide (3) und zu einer Permeabilitätserhöhung des Arteriengewebes, die sich an einem vermehrten Einstrom von Cholesterin, Fettsäuren (3) und Elektrolyten (5) nachweisen läßt. Die nachfolgende Arbeit beschreibt eine Steigerung

des Einbaues von ^{35}S -Sulfat in die sauren Mucopolysaccharide¹⁾ der Aorta der Ratte bei spontanem bzw. Desoxycorticosteronacetat-induziertem Hypertonus bei *in vitro*-Inkubation, zeigt jedoch, daß lediglich die spezifische Radioaktivität des Dermatansulfats und Heparansulfats, nicht jedoch diejenige des Chondroitinsulfats gesteigert ist.

¹⁾ Chondroitin-4- bzw. Chondroitin-6-sulfat (Chondroitinsulfat A bzw. C); Dermatansulfat (Chondroitinsulfat B); Heparansulfat (Heparinmonosulfat, Heparitinsulfat); saure Mucopolysaccharide: Mischung saurer Mucopolysaccharide mit nicht bekanntem Anteil an Heparan-, Chondroitin- bzw. Dermatansulfat.

Methodik

Tierversuche

Für die Versuche wurden die Aorten von 4–5 Monate alten 310–440 g schweren Wistarratten beiderlei Geschlechts verwendet, die Standarddiät (Altromin) erhielten. Normotone Versuchstiere hatten einen systolischen Blutdruck von 129 ± 5 mm Hg. Bei den Versuchstieren mit genetischem Hypertonus, die durch Inzucht einzelner Tiere mit spontanem (genetischem) Hypertonus von 140–160 mm Hg über mindestens 3 Generationen erhalten wurden, betrug der Durchschnittswert für den systolischen Blutdruck 173 ± 11 mm Hg. Neben dem Hypertonus wiesen diese Versuchstiere eine herabgesetzte Glucosetoleranz auf.

Durch Injektion von je 50 mg Desoxycorticosteronacetat (Cortison)/kg Körpergewicht 10 und 20 Tage vor dem Inkubationsversuch wurde bei normotonen Ratten ein Hypertonus von durchschnittlich 169 ± 7 mm Hg erzeugt. Diese Gruppe erhielt zusätzlich 1% Natriumchlorid und 5% Glucose im Trinkwasser. Der Blutdruck wurde durch plethysmographische Messung an der Schwanzarterie (6) der nichtnarkotisierten Ratte bestimmt und während der Vorversuchsperiode laufend gemessen. Die Unterschiede im Blutdruck normotoner und hypertoner Versuchstiere sind statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Inkubationsversuche

Unmittelbar nach Tötung der Versuchstiere durch Dekapitation wurde die Aorta durch saubere Präparation von anhängendem Fett- und Bindegewebe befreit. Je 10 Aorten einer Versuchsgruppe, entsprechend einem Frischgewicht von 1,4–1,8 g wurden in 8 ml einer 0,1% Glucose, 100 μ g D- α -Aminobenzylpenicillintrihydrat, 30 μ C Na₂³⁵SO₄ und 10 μ C Na-Acetat[1-¹⁴C] (spezifische Aktivität 40 μ C/mMol) enthaltenden gepufferten Ringerlösung für 6 Std. bei 37° unter einer Gasphase von O₂/CO₂ (95/5, v/v) — wie früher beschrieben (7) — in der Warburg-Apparatur inkubiert.

Lipidanalysen

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Aorten in eiskalter Ringerlösung gespült und getrennt nach Versuchsgruppen mit dem 15fachen Volumen Chloroform/Methanol (2:1, v/v) 1 Min. mit dem Ultraturax (Fa. Jancke und Kunkel, Staufen) homogenisiert und für 24 Std. unter Schütteln bei Raumtemperatur extrahiert. Aus dem durch Filtration gewonnenen, die Aortenlipide enthaltenden Lösungsmittel wurde überschüssiges Acetat[1-¹⁴C] bzw. ³⁵S-Sulfat durch Waschen nach FOLCH (8) entfernt. Die Gewinnung der Gesamtlipide, ihre Trennung in Lipid-

unterfraktionen, ihre quantitative Bestimmung und die Radioaktivitätsmessungen wurden — wie früher beschrieben (9) — durchgeführt.

Mucopolysaccharidanalysen

Das nach Lipidextraktion verbleibende fettfreie Gewebe wurde nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels und Wägung zur Darstellung der sauren Mucopolysaccharide durch sukzessive Proteolyse mit Papain und Pronase aufgeschlossen und die gesamten sauren Mucopolysaccharide quantitativ erhalten (10) (Analysen s. Tab. 2). Die Trennung der sauren Mucopolysaccharide in Einzeltypen (Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat) wurde durch Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie (Fa. Macherey und Nagel, Büren) in 0,2N Zinkacetatlösung während 150 Min. bei 4°, 220 V, 0,5 mA/cm vorgenommen. Nach Anfärben mit Gentianaviolett wurden die dem Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat entsprechenden und durch Referenzpräparate identifizierten, scharf voneinander getrennten Zonen ausgeschnitten und entweder zur Bestimmung der Radioaktivität durch Szintillationsmessung oder nach Elution des Farbstoffes zur quantitativen Bestimmung verwendet. Die Bestimmung des Gesamthexosamins, der Uronsäuren und des Estersulfats erfolgte nach früher beschriebenen Methoden (10). Die Konzentration der Glucose und des Lactats im Inkubationsmedium wurde nach Arbeitsvorschriften der Fa. Boehringer, Mannheim GmbH (Nr. 15994 TGAA bzw. 15972 TLAA), bestimmt.

Ergebnisse

Mucopolysaccharidstoffwechsel

Bei genetischem und DOCA-induziertem Hypertonus ist der Gehalt der Mucopolysaccharide in der Aorta um 17 bzw. 15% im Vergleich zu normotonen Ratten heraufgesetzt (Tab. 1). Die in die sauren Mucopolysaccharide inkorporierte ³⁵S-Sulfataktivität ist — bezogen auf die dem Inkubationsansatz zugegebene Gesamt-Radioaktivität (100%) bei Hypertonus im Vergleich zum Normotonus (4,6%) um 60 bzw. 56% erhöht (Tab. 2). Da die Absolutmenge der sauren Mucopolysaccharide bei Hypertonus größer ist, ist die spezifische Radioaktivität der gesamten sauren Mucopolysaccharide nur geringfügig (18% beim DOCA-Hypertonus) oder gar nicht (genetischer Hypertonus) erhöht.

Tab. 1

Gewebskonzentration, chemische Zusammensetzung und Verteilungsmuster der sauren Mucopolysaccharide (Gesamt-sMPS) in der Aorta normotoner und hypertoner Ratten (Mittelwert aus 2 Versuchen mit je 10 Versuchstieren/Gruppe)

Versuchsgruppe	mg Gesamt-sMPS/g Frischgewebe	μ Mol/mg Gesamt-sMPS			% Anteil an Gesamt-sMPS		
		Gesamt-hexosamin	Uronsäure	Sulfat	Chondroitin-	Dermatan-	Heparansulfat
Normotonus	0,79	1,41	1,47	1,31	30,5	31,5	38,0
Genetischer Hypertonus	0,93	1,39	1,42	1,33	30,8	33,3	35,8
DOCA-induzierter Hypertonus	1,19	1,42	1,46	1,33	29,7	29,7	41,1

Tab. 2

Inkorporierte ³⁵S-Sulfat-Gesamtaktivität, spezifische Radioaktivität und proz. Anteil der in die Mucopolysaccharide (Gesamt-sMPS) inkorporierten Radioaktivität für Chondroitin-, Dermatan- und Heparansulfat aus Rattengewebe normotoner und hypertoner Ratten nach in vitro-Inkubation in Gegenwart von 30 μ C ³⁵S-Sulfat. Mittelwerte aus 2 Versuchen mit je 10 Versuchstieren/Gruppe

Versuchsgruppe	% der im Versuch inkorporierten ³⁵ S-Aktivität	Gesamt-sMPS	Imp./Min. $\times 10^3$ /mg			% der inkorporierten ³⁵ S-Aktivität		
			Chondroitin-	Dermatan-	Heparansulfat	Chondroitin-	Dermatan-	Heparansulfat
Normotonus	4,6	275	154	352	309	17,1	40,3	42,7
Genetischer Hypertonus	7,4	325	141	435	381	13,4	44,6	42,0
DOCA-induzierter Hypertonus	7,2	283	106	449	289	10,9	47,1	42,0

Tab. 3

Lipidgehalt, in die Lipide inkorporierte ^{14}C -Radioaktivität und spezifische Radioaktivität von Lipiden bzw. Lipidunterfraktionen in Arterien von Ratten mit Normotonus und Hypertonus. Mittelwerte wie in Tabelle 1 und 2

Versuchsgruppe	Gesamt-lipide mg/g Frischgewebe	Inkorporierte ^{14}C -Radioak- tivität %	Spezifische Radioaktivität Imp./Min. $\cdot 10^3$ /mg Lipid bzw. Lipidfraktion				Freie Fettsäuren
			Gesamt-lipide	Triglyceride	Cholesterin	Phospholipide	
Normotonus	58,7	9,6	30,6	27,1	51,8	20,6	43,9
Genetischer Hypertonus	63,8	5,9	17,1	15,3	33,0	18,7	29,9
DOCA-Hypertonus	46,6	8,8	34,9	30,2	40,5	23,8	49,0

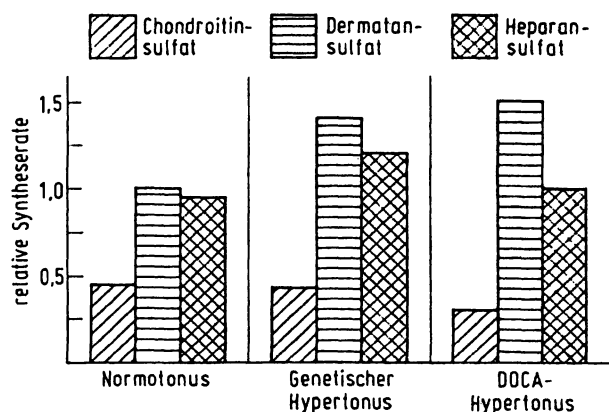


Abb. 1

Relative Syntheseraten von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat der Rattenaorta bei Normotonus und Hypertonus nach in vitro-Inkubation von ^{35}S -Sulfat. Weitere Einzelheiten s. Text. Die relative Syntheserate des Dermatansulfat bei Normotonus ist gleich 1,0 gesetzt

Daten über das Verteilungsmuster der individuellen Mucopolysaccharide und ihre spezifische Radioaktivität sind in Tabelle 1 und 2 enthalten. In der Aorta der normotonen Ratte sind Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat nachweisbar, die je 1/3 der gesamten Mucopolysaccharide ausmachen. Hyaluronat fehlt. Der prozentuale Anteil der einzelnen Mucopolysaccharidtypen ist bei Hypertonus innerhalb der Fehlerbreite der Bestimmungsmethode unverändert, doch zeigen sich in der spezifischen Radioaktivität der einzelnen Mucopolysaccharidtypen Unterschiede. Beim Normotonus ist die spezifische Radioaktivität des Dermatansulfat bzw. Heparansulfat doppelt so hoch wie diejenige des Chondroitinsulfat. Dies entspricht früheren Beobachtungen an Rinderarteriengewebe (10). Beim Hypertonus sind die spezifische Radioaktivität und Syntheseraten der sauren Mucopolysaccharide erhöht (Tab. 2, Abb. 1). Die Untersuchung der individuellen Mucopolysaccharide läßt jedoch erkennen, daß an dieser Erhöhung lediglich Dermatan-sulfat und Heparan-sulfat beteiligt sind, deren spezifische Aktivität bzw. Syntheseraten um 23% bzw. 37% und um 25% bzw. 11% zunehmen. Dagegen sind die entsprechenden Werte für Chondroitinsulfat bei Hypertonus unverändert (genetischer Hypertonus) oder herabgesetzt (DOCA-Hypertonus).

Aus den analytischen Daten (Tab. 1) und den Radioaktivitätsmessungen (Tab. 2) lassen sich für die einzelnen Mucopolysaccharidtypen die inkorporierte Gesamtaktivität und — unter Berücksichtigung des prozen-

tualen Anteils an den Gesamtmucopolysacchariden — die relativen Syntheseraten berechnen. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der spontane Hypertonus ist von einer Veränderung der Aktivität einiger Mucopolysaccharid-abbauender Enzyme begleitet. Die am Abbau des Chondroitinsulfat und Heparansulfat beteiligte β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31) bzw. α -N-Acetyl-Hexosaminidase (EC 3.2.1. . .) sind in ihrer Aktivität von 8,6 bzw. 21,9 mU auf 4,5 bzw. 11,3 mU/g Frischgewebe herabgesetzt. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen über einen Anstieg der β -Glucuronidaseaktivität in der Aorta von Kaninchen mit arteriellem Hypertonus (11).

Messungen über die Glucoseaufnahme und Lactatbildung haben ergeben, daß bei normotonen Ratten von der Aorta etwa 45%, bei genetischem Hypertonus jedoch 56% der aufgenommenen Glucose zu Lactat glykolytisiert werden.

Lipidstoffwechsel

Der Gehalt an Gesamtlipiden im Arteriengewebe (Tab. 3) ist bei genetischem Hypertonus unverändert. Der um 20% herabgesetzte Lipidgehalt der Aorta bei DOCA-Hypertonus kann durch die Lipid-mobilisierende Glucocorticoidnebenwirkung des Desoxycorticosteronacetat erklärt werden. Der Einbau von ^{14}C -Aktivität in die Gesamtlipide ist bei genetischem Hypertonus verringert und auch die spezifische Radioaktivität der Triglyceride und der übrigen Lipidunterfraktionen ist gegenüber dem Normotonus herabgesetzt (Tab. 3). Das Lipidverteilungsmuster war jedoch in allen Versuchsgruppen gleich. Der Anteil der quantitativ am stärksten vertretenen Triglyceridfraktion betrug 87,6% (Normotonus), 86,4% (genetischer Hypertonus) und 85,2% (DOCA-Hypertonus).

Diskussion

Die von MATTHES und Mitarbeitern (3) beobachtete beträchtliche Steigerung des Einbaues von ^{35}S -Sulfat in die sulfatierten Mucopolysaccharide der Aorta bei chronischem renalen Hypertonus der Ratte wird durch die beschriebenen Versuche bestätigt, wenn auch die Einbausteigerung bei dem hier untersuchten genetischen und DOCA-induzierten Hypertonus wesentlich geringer war. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber darüber hinaus, daß die Erhöhung des Sulfateinbaues (1) durch eine absolute Zunahme aller individuellen Mucopolysaccharide im Arteriengewebe und (2) durch selektive Erhöhung der spezifischen Aktivität des Der-

matansulfat und Heparansulfat zustande kommt. Beim Chondroitinsulfat ist zwar die Absolutmenge, nicht jedoch die spezifische Radioaktivität erhöht. Da anzunehmen ist, daß der Sulfattransfer bei der Synthese des Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat und Heparansulfat aus dem gleichen 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Pool erfolgt, läßt sich die Erhöhung der spezifischen Radioaktivität des Dermatan-sulfat und Heparansulfat nur mit einer Steigerung ihrer Syntheseraten bzw. mit einer Erhöhung der Aktivität der spezifischen Sulfotransferasen erklären. Wäre die Zunahme der spezifischen Aktivität der Mucopolysaccharide und die Zunahme der inkorporierten Gesamtaktivität lediglich durch höhere Markierung des Sulfatpools bei Hypertonus bedingt, müßten sie sich in gleicher Weise auf die

Synthese des Chondroitinsulfat auswirken, was jedoch nicht der Fall ist.

Das unterschiedliche Verhalten der individuellen Mucopolysaccharide der Aorta bei Hypertonus deutet auf unabhängige Regulation ihrer Synthese und auf unterschiedliche Funktionen hin. Daß bei chronischem Hypertonus auch der Energiestoffwechsel des Arterien-gewebes Veränderungen erfährt, wird durch die erhöhte — bereits bekannte (3) — Lactatbildung belegt. Eine Steigerung des Einbaues von ^{14}C -Acetat in die Gesamtlipide bzw. in die Lipidunterfraktionen wurde im Gegensatz zu Voruntersuchern (3) nicht beobachtet. Beim genetischen Hypertonus kann dies jedoch durch die herabgesetzte Glucosetoleranz und deren Auswirkungen auf die Lipidsynthese erklärt werden.

Literatur

1. GROLLMANN, A., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N. Y. 57, 102 (1964). — 2. CLAIR, R. W. ST., N. H. BOOTH und M. L. HOPWOOD, Amer. J. Physiol. 210, 880 (1966). — 3. MATTHES, K. J., G. JUNGE-HÜLSING, G. SCHMITT, H. WAGNER, W. OBERWITTLER und W. H. HAUSS, J. Atheroscler. Res. 9, 305 (1969). — 4. POSTNOV, YU. V. und N. T. KOVALEVA, Arkh. Patol (USSR) 31, 60 (1969) Zit. nach Chem. Abstr. 71, 2031e (1969). — 5. BEILIN, L. J., R. GARCIA und E. BLACKWELL, Clin. Sc., London 36, 387 (1969). — 6. GEROLD, M., A. HÜRLIMANN und C. VON PLANTA, Helvet. physiol. pharmacol. Acta 24, 58 (1966). — 7. KRESSE, H. und G. WESSELS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1605 (1969). — 8. FOLCH, J., M. LEES und G. H. SLOANE STANLEY, J. biol. Chemistry 226, 497 (1957). — 9. KRESSE, H., I. FILIPOVIC und E. BUDDECKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1611 (1969). — 10. KRESSE, H. und E. BUDDECKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 151 (1970). — 11. KASATKINA, L. V., A. S. ALEKSEVA und K. M. MARKOV, Zit. n. Chem. Abstr. 70, 18309n (1969).

Prof Dr. med. E. Buddecke
Physiol.-chem. Inst.
4400 Münster
Waldeyerstr. 15